

## **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE E MASSA MITOCONDRIAL SOB O EFEITO DA MELATONINA (MLT) EM CULTURA DE CÉLULAS DE LINHAGEM DU145 DE CANCER DE PROSTATA**

ADRIÉLE DA SILVA<sup>1</sup>; ALESSANDRA CORTES TEOTONIO<sup>2</sup>; GIOVANA DUZZO GAMARO<sup>3</sup>; CLEVERSON MORAES DE OLIVEIRA<sup>4</sup>; CLARA CAMACHO DOS REIS<sup>5</sup>; IZABEL CRISTINA CUSTODIO DE SOUZA<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – *adrielegssilva31@gmail.com*

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – *alessandra.cortes@hotmail.com*

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – *giovanaagamaro@hotmail.com*

<sup>4</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Sul – *cle218@outlook.com*

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – *clinhacla@gmail.com*

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas – *belcustodio20@yahoo.com.br*

### **1. INTRODUÇÃO**

A próstata é um órgão do sistema reprodutor masculino, tem como função a produção do líquido prostático, constituinte do sêmen. (INCA, 2017). Quando ocorre um desequilíbrio na proliferação e diferenciação celular desse órgão, desencadeia o câncer. (FRIESTINO, 2013).

O câncer de próstata (Pca) é a segunda neoplasia com maior taxa de mortalidade entre os homens, segundo o Instituto nacional do Câncer (INCA), a cada ano novos casos surgem (INCA 2018).

O Pca é uma patologia que apresenta, como característica geral, um crescimento lento e assintomático, culminando no difícil diagnóstico (BARCELAR et al, 2015).

Dentre a diversidade de tratamentos existentes, mesmo a quimioterapia e a radioterapia, não são totalmente eficazes, ou ausente de efeitos adversos. Na busca de tratamentos que sejam realmente inibam a progressão do câncer de próstata, as pesquisas se baseiam em estudos de novas substâncias, como por exemplo o hormônio conhecido como melatonina (SOARES, 2011).

A melatonina, é uma indolamina, produzida pela glândula pineal, responsável pela regulação o sistema neuroendócrino, bem como, o controle do ritmo circadiano e de diversos processos fisiológicos em vertebrados. O hormônio possui pico de produção noturna, decorrente da sua instabilidade à luz (SOARES 2011).

A melatonina vem sendo muito estudada devido ao seu potencial antiproliferativo em células tumorais da próstata (LNCap, PC-3 e DU 145). Estudos realizados por Soares e col., (2011) mostrou que homens acometidos por

Pca apresentavam níveis baixos de melatonina. Esta indolamina possivelmente atuou como um modulador no Pca, regulando o ciclo do sono e sobre as células tumorais (SOARES 2011).

Desta forma, busca-se a necessidade de um estudo mais aprofundado sobre os processos que envolvem a ação da melatonina sobre a linhagem celular de câncer de próstata DU 145-independente de androgênio. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito direto da melatonina em diferentes tempos e doses sobre a linhagem DU 145.

## 2. METODOLOGIA

A linhagem celular DU145 foi cultivada com o meio RPMI 1640 (Sigma Aldrich – R6504), suplementado com 10% Soro Fetal Bovino (GIBCO), 1% de penicilina e estreptomicina e 1µl/ml de anfotericina, então incubadas a 37°C com 5% CO<sub>2</sub> em ambiente úmido.

A células, após atingirem 90% de confluência, foram transferidas para placas de 24 ou 12 poços (com 30.000 células/poço e 100.000 células/ poço, respectivamente). Após incubação por 72h, foi realizado o tratamento com 10 µM e 100 µM de melatonina (Sigma Ref. CAS 7331-4) durante 24h, 48h, 72h, 120h e 240h. O ensaio de viabilidade celular foi realizado pelo método do brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium] (MTT-Sigma Ref.M2128).

A análise da massa e atividade mitocondrial foi realizado pelo método de fluorescência, utilizando sondas MitoTracker <sup>TM</sup> Red (MTR) e MitoTracker <sup>TM</sup> Green (MTG) por meio de citômetro de fluxo BD FACSCalibur (BD Biosciences, EUA). As unidades de valores de fluorescência para MTR e MTG foram obtidas usando o software FCS Express 4 (DeNovo, Canadá).

Os dados obtidos foram apresentados pela média ± erro padrão da média. Para análise estatística foi utilizado o teste ANOVA one-way e post hoc de Tukey (p<0,05). Todos os dados foram analisados pelo programa IBM® SPSS® statistics 20.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados expressos nas tabelas 1 e 2, compilam os dados obtidos para os ensaios de MTT e de Mitotracker Green e Red, respectivamente.

**Tabela 1:** Resultados do ensaio com MTT (%), nas concentrações de melatonina 10 µM e 100 µM, tratadas durante 24 horas, 48 horas, 72 horas, 120 horas e 240 horas.

Grupo/Tempo	24h	48h	72h	120h	240h
Controle	2,68 ± 0,05	2,61 ± 0,04	2,50 ± 0,04	2,42 ± 0,04	2,49 ± 0,08
MLT 10 µM	1,56 ± 0,07	1,59 ± 0,03	1,36 ± 0,02	1,15 ± 0,04	1,92 ± 0,11
MLT 100 µM	1,05 ± 0,03	0,87 ± 0,05	0,84 ± 0,02	0,86 ± 0,07	1,56 ± 0,07

**Tabela 2:** Resultados obtidos através do ensaio com Mitocraker Green (MTG) e Mitotracker Red (MTR) e a relação MTG/MTR, para os tempos de 24, 48, 72, 120 e 240 horas nas concentrações de 10 e 100 µM de melatonina.

		24h	48h	72h	120h	240h
MTG (Vf)	Controle	90,3±2,4	49,7±7,8	48,5±9,5	48,4±4,2	348,1± 26,2
	10 µM	115,1±4,4	56,6±3,9	66,1±3,6	77,9±8,1	325,1±16,3
	100 µM	117,9±3,3	115,2±15,5	74,8±4,0	134,3±24,9	530,6± 24,2
MTG (Vf)	Controle	61,1±5,5	21,2±4,5	10,9±3,2	12,1±2,2	132,5±13,6
	10 µM	64,7±8,7	24,4±1,7	13,8±0,7	29,4±9,1	114,6±6,4
	100 µM	77,0±1,8	37,5±7,1	11,0±0,8	46,9±11,4	85,1±6,9
MTG/MTR (Vf)	Controle	0,6±0,04	0,4±0,02	0,3±0,01	0,2±0,02	0,4±0,01
	10 µM	0,6±0,07	0,5±0,01	0,2±0,01	0,4±0,07	0,4±0,01
	100 µM	0,7±0,02	0,3±0,01	0,2±0,01	0,4±0,05	0,2±0,1

Com base nos resultados (tabela 1), é possível observar uma diminuição significativa nas células tratadas com 10 µM e 100 µM de melatonina em todos os tempos analisados, quando comparados aos seus controles específicos, pode-se afirmar que a concentração com 100 µM, mostrou um efeito antiproliferativo. Estes resultados corroboram com o estudo de Jung-Hynes e colaboradores que observaram uma diminuição de células DU 145 em cultura com um aumento gradativo da concentração de MLT (10nM a 2mM) (Jung-Hynes et al., 2011).

Em relação ao tempo de exposição ao hormônio MLT, verificou-se uma redução do número de células tempo-dependente até 120h de tratamento. Um estudo de Hevia e colaboradores mostraram que a entrada da MLT no interior das células DU 145 ocorria lentamente, justificando a necessidade de um maior tempo de exposição das células ao hormônio (Hevia et al., 2010).

Os resultados obtidos pela análise por fluorescência (Tabela 2) pode-se observar que o MTR no tempo de 240 horas e na concentração de 100 µM de MLT mostrou uma diminuição significativa da fluorescência ( $p < 0.05$ ), quando comparado ao respectivo controle. Por outro lado, o MTG na concentração de

100µM de MLT em todos os tempos de exposição, demonstrou um aumento na fluorescência em relação aos respectivos controles, o mesmo resultado foi observado na concentração 10 µM para o tempo de 24h.

O aumento da massa mitocondrial (MTG) não é acompanhado pelo aumento da sua função (MTR), podendo indicar um edema e disfunção da organela. Essa disfunção mitocondrial é comprovada quando se realiza a relação MTR / MTG, em que o aumento do MTG nas células tratadas com 100 µM de MLT, a partir de 48h, indicam prejuízo da organela (Agnello et al., 2008; Lima et al., 2018).

#### 4. CONCLUSÕES

Observando os resultados obtidos, pode-se concluir que o tratamento com melatonina na linhagem DU 145 em diferentes tempos e concentrações, reduz o número de células, bem como, leva a disfunção mitocondrial. Porém ainda serão necessários mais estudos para entender melhor os mecanismos envolvidos nesse processo.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGNELLO, M.; MORICI, G.; RINALDI, A. M. A method for measuring mitochondrial mass and activity. **Cytotechnology**, Dordrecht, v. 56, n. 3, p. 145-149, 2008
- INCA, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Próstata. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br>>. Acesso em: 28 set. 2017
- BACELAR, J.; JANUÁRIO, A.; MENEZES, C. S.; BARBOSA, C. A.; FREITAS, G. B. S.; SILVA, G. G.; VAZ, J. P. S.; SOUZA, M. L.; OLIVEIRA, T. M. Prostate cancer: methods of diagnosis, prevention and treatment. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 10, n. 3, p. 40-46, 2015.
- HEVIA, D. et al. Monitoring intracellular melatonin levels in human prostate normal and cancer cells by HPLC. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 397, n. 3, p. 1235-1244, 2010.
- JUNG-HYNES, B. et al. Melatonin, a novel Sirt1 inhibitor, imparts antiproliferative effects against prostate cancer in vitro in culture and in vivo in TRAMP model. **Journal of Pineal Research**, v. 50, n. 2, p. 140-149, 2011.
- LIMA, K. G. et al. Octyl gallate reduces ATP levels and Ki67 expression leading HepG2 cells to cell cycle arrest and mitochondria-mediated apoptosis. **Toxicology in Vitro**, v. 48, p. 11-25, 2018.
- SOARES, J. M.; FERREIRA, C. S.; MAGANHIN, C. C.; SIMÕES, R. S.; CASTELLO, M. J. B.; BARACAT, E. C. Melatonina: modulador de morte celular. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v.56, n.6, p.715-718, 2010.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1, p. 55-63, 1983
- SOARES, J. M.; FERREIRA, C. S.; MAGANHIN, C. C.; SIMÕES, R. S.; CASTELLO, M. J. B.; BARACAT, E. C. Melatonina: modulador de morte celular. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v.56, n.6, p.715-718, 2010.